



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**THUANNY LINS MONTEIRO ROSA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E STATUS  
NUTRICIONAL DE *Lecythis pisonis* CAMBESS.**

**JERÔNIMO MONTEIRO – ES**

**2018**

**THUANNY LINS MONTEIRO ROSA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E  
STATUS NUTRICIONAL DE *Lecythis pisonis* CAMBESS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

Coorientadores: Prof. Dr. Edilson Romais Schmidt e Prof. Dr. José Carlos Lopes

**JERÔNIMO MONTEIRO – ES**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP) (Biblioteca  
Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Bibliotecário: Felício Gomes Corteletti – CRB-6 ES-000646/O

---

R788d Rosa, Thuanny Lins Monteiro, 1993-  
Diversidade genética, comportamento morfofisiológico e status  
nutricional de *Lecythis pisonis* Cambess / Thuanny Lins Monteiro  
Rosa. – 2018.  
46 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.  
Coorientador: Edilson Romais Schimildt ; José Carlos Lopes.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Sapucaia. 2. Biometria. 3. Selênio. 4. Germinação. 5. Análise de  
imagem. I. Alexandre, Rodrigo Sobreira. II. Schimildt, Edilson Romais.  
III. Lopes, José Carlos. IV. Universidade Federal do Espírito Santo.  
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 630

---

**DIVERSIDADE GENÉTICA, COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E STATUS  
NUTRICIONAL DE *Lecythis pisonis* CAMBESS**

**Thuanny Lins Monteiro Rosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.



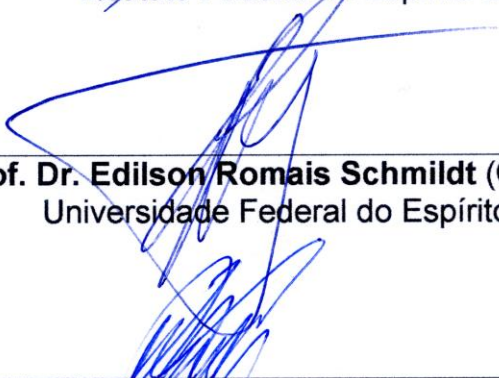
---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Khétrin Silva Maciel** (Examinadora externa)  
Universidade Federal do Sul da Bahia



---

**Prof. Dr. João Paulo Beteste de Oliveira** (Examinador externo)  
Instituto Federal do Espírito Santo



---

**Prof. Dr. Edilson Romais Schmidt** (Coorientador)  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

**Prof. Dr. José Carlos Lopes** (Coorientador)  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

**Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre** (Orientador)  
Universidade Federal do Espírito Santo

## DEDICATÓRIA

À minha mamãe Maria Aparecida Fonseca Lins.

Ao meu marido Rômulo da Silva Rosa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida, misericórdia, providência, ânimo, estímulo, proteção, amor, fidelidade, direção e por me ensinar a cada dia que tudo é possível àquele que crê! Por ser meu socorro bem presente no momento de angústia. O Senhor foi e sempre será a minha base para eu chegar a qualquer lugar da minha vida. Serei grata a Ti por toda minha vida, eu te amo, Senhor!

À minha mãe Maria Aparecida Fonseca Lins pelo amor, dedicação e incentivos a estudar cada dia mais. Se não fosse o seu incansável esforço, desde quando eu nasci, eu não estaria concluindo esta etapa.

Ao meu esposo Rômulo da Silva Rosa pelo amor, companheirismo, inúmeras ajudas em momentos críticos e por me fortalecer em oração. Sei que em muitas vezes você não entendeu o que eu fazia, mas me apoiou nos momentos em que eu mais precisava. Você foi fundamental para que eu chegasse a este ponto!

Às amigas que me incentivam a seguir a vida acadêmica, às que mesmo distantes, estão bem próximas. Mensagens e ligações de vocês fizeram a diferença no meu dia, deixavam-me mais motivada e animada a persistir independentemente da situação enfrentada. Em especial à Caroline Palacio de Araujo, que em pouco tempo se tornou minha parceira no laboratório, por seu entusiasmo contagiante, dedicação ao trabalho e estar sempre me incentivando a fazer mais e melhor. Você conseguiu me arrancar risadas com seu jeito peculiar de ser.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, por ser um profissional excepcional e por seus incontáveis ensinamentos, dedicação, persistência e paciência comigo. Por ter a oportunidade de trabalhar com o senhor, pelas ideias brilhantes de trabalhos incríveis que o senhor tem, por estar presente em cada etapa deste e todos os trabalhos que tenho. O senhor é um exemplo de pesquisador pelo empenho e compromisso; aprendi com o senhor a amar a pesquisa e a não ficar no “olhar o experimento”. Levarei seus ensinamentos para a vida toda!

À comissão examinadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Khétrin Silva Maciel, Prof. Dr. João Paulo Bestete de Oliveira, Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt e Prof. Dr. José Carlos Lopes. Aos senhores pela disponibilidade de estarem na comissão examinadora, as contribuições e ensinamentos de vocês serão levados para a vida toda.

Ao Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt pela coorientação e auxílio nas análises estatísticas desde o início do trabalho e ao Prof. Dr. José Carlos Lopes pela

coorientação, atenção e palavras de ânimo. Sou grata pelos ensinamentos dos senhores a mim concedidos.

Ao agrônomo Charles Kamke e sua equipe, pela coleta dos frutos de sapucaia e disponibilização das sementes para a condução deste trabalho.

Ao Yan Serafim Schwider, por me ajudar na avaliação inicial do experimento de germinação, por seu bom ânimo de sempre, que alegrava o laboratório e por me ensinar alguns procedimentos práticos e básicos de laboratório.

Ao Prof. Dr. Mário Tommasiello Filho, pela disponibilidade em nos atender e tornar possível as análises de raios X no Laboratório de Anatomia, Identificação e Densitometria de Raios X em Madeira da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo. Ao Prof. Dr. João Paulo Bestete de Oliveira pelo ensinamento indispensável para análise e processamento das imagens de raios X, bem como na geração da metodologia para se obter a densidade pelas imagens.

À Prof. Dra. Márcia Flores da Silva Ferreira por ter me recebido no Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal (LGMV) de braços abertos e disponibilizado o material e os reagentes para a análise molecular. À Dra. Liana Hilda Golin Mengarda, que me ensinou e acompanhou todo o tempo tornando possível a análise molecular e a equipe do LGMV, pelas dicas e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Adésio Ferreira, pelo incansável auxílio com as análises estatísticas, pelos conselhos e aprendizado a mim concedido.

Ao Prof. Dr. Humberto Fantuzzi Neto e ao técnico Gilson Barbosa São Teago, por disponibilizar o Laboratório de Química da Madeira e auxiliar nas análises químicas do tegumento das sementes, respectivamente. Ao marceneiro Elecy Palácio Constantino, por me auxiliar no corte das sementes. À Prof. Dra. Graziela Baptista Vidaurre, por disponibilizar os equipamentos para as análises. Ao João Gabriel, por ensinar-me a utilizar o software necessário para a avaliação interna das sementes. Ao Prof. Dr. Sidney Sara Zanetti e ao técnico Alexandro José de Almeida, por terem me recebido no Laboratório de Recursos Hídricos e Solos, disponibilizado reagentes e me ensinado a fazer as análises químicas das castanhas.

Aos funcionários da Universidade Federal do Espírito Santo, que são muito prestativos e sempre me atenderam com carinho, em especial à Adriane da Pascoa Galo, por ter me socorrido em momentos difíceis, pelos conselhos e conversas que alegravam os meus dias.

À toda a equipe do Laboratório de Sementes Florestais, que esteve comigo durante este período, tornando o ambiente interativo, pelas trocas de informações, nas inúmeras conversas.

Aos professores que ministraram disciplinas que ampliaram meus conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, pela oportunidade de cursar o mestrado em Ciências Florestais, que está sendo um passo extremamente importante em minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de produtividade em pesquisa aos professores Dr. José Carlos Lopes e Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal do Espírito Santo pelo espaço cedido para o desenvolvimento deste trabalho, bem como os equipamentos e estruturas necessários.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para que nosso trabalho chegasse até este ponto, fica registrada minha gratidão!



## RESUMO

ROSA, Thuanny Lins Monteiro. **Diversidade genética, comportamento morfofisiológico e status nutricional de *Lecythis pisonis* Cambess.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientadores: Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt e Prof. Dr. José Carlos Lopes.

A sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.) é uma árvore da família Lecythidaceae, que produz castanhas comestíveis, saborosas e nutritivas, além de possuir potencial ornamental e madeireiro. Entretanto, seus recursos ainda são subutilizados, visto que é apreciado e conhecido apenas em comunidades locais. Objetivou-se com este trabalho, analisar a diversidade genética por meio de características juvenis e marcadores moleculares, o comportamento morfofisiológico e o *status* nutricional de castanhas de sapucaia. As sementes das 21 matrizes de sapucaia foram submetidas a avaliações biométricas, químicas e fisiológicas. As sementes também foram submetidas aos raios X para o estudo interno da semente e determinação da densidade. Para o *status* nutricional das castanhas, foi extraído o selênio, os macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu e Mn). Analisaram-se a divergência fenotípica, por meio do *heat map* de 27 características, e a molecular, pelo marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), por meio de 96 primers, dos quais 13 foram selecionados para a caracterização das amostras em bulk das matrizes de sapucaia. As matrizes 5; 8 e 21 são as mais divergentes fenotipicamente, principalmente pela quantidade de potássio e fósforo na matriz 5, manganês na 8 e selênio na 21, entretanto, as demais também não apresentaram similaridade. As características que mais contribuíram para a divergência genética, em ordem decrescente, foram: o Se>TME>Germinação>Fe>Emergência. Dos 74 locos produzidos pelos 13 *primers* selecionados, 71 foram polimórficos, isto é 96,7% de polimorfismo, evidenciando alta divergência genética. Na diversidade genética das matrizes de sapucaia a porcentagem de polimorfismo encontrada nas 20 amostras é alta (96,7%). As castanhas das 21 matrizes de sapucaia não apresentaram níveis tóxicos de selênio, macro e micronutrientes. As matrizes 8 (175,4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e 20 (71,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) foram selecionadas pela quantidade de manganês e ferro nas castanhas, respectivamente. O teor de selênio nas castanhas de sapucaia variou de 0,10 (matriz 11) a 32,40  $\mu\text{g g}^{-1}$  (matriz 21), sendo a matriz 21 selecionada

por fornecer em média 225 µg de Se por castanha, com recomendação de consumo diário de ¼ de suas castanhas. Os valores de densidade obtidos pela análise de imagens de raios X foram em média 4% diferentes aos obtidos em laboratório. Esta nova metodologia possibilita a determinação da densidade de forma precisa e mais rápida à convencional. A região inferior ou do hilo e a região superior, locais onde ocorrem a protrusão da raiz primária e o hipocótilo, respectivamente, apresentam o tegumento interrompido, com densidade em torno de 0,2 g cm<sup>-3</sup>. A germinação da sapucaia é desuniforme, lenta e atinge no máximo 63%, com destaque para a matriz 11, com maior vigor.

**Palavras-chave:** Sapucaia, divergência genética, biometria, selênio, germinação, análise de imagem.

## ABSTRACT

ROSA, Thuanny Lins Monteiro. **Genetic diversity, morphophysiological behavior and nutritional status of *Lecythis pisonis* Cambess.** 2018. Dissertation (Master in Forest Sciences) - Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisor: Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt e Prof. Dr. José Carlos Lopes.

The sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.) is a tree of the family Lecythidaceae, which produces edible, tasty and nutritious nuts, besides having ornamental and logging potential. However, its resources are still underutilized, as it is appreciated and known only in local communities. The objective of this work was to analyze the genetic diversity by means of juvenile characteristics and molecular markers, the morphological and nutritional status of sapucaia nuts. The seeds of the 21 sapucaia matrices were submitted to biometric, chemical and physiological evaluations. The seeds were also submitted to X-rays for the internal study of the seed and determination of the density. For the nutritional status of nuts, selenium, macro (N, P, K, Ca, Mg and S) and micronutrients (Fe, Zn, Cu and Mn) were extracted. We analyzed the phenotypic divergence by means of the heat map of 27 characteristics and molecular, by the ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) marker, by means of 96 primers, of which 13 were selected for the characterization of the bulk samples of the matrices of sapucaia. The dies 5; 8 and 21 are the most phenotypically divergent, mainly by the amount of potassium and phosphorus in matrix 5, manganese in 8 and selenium in 21, however, the others also did not present similarity. The characteristics that contributed the most to the genetic divergence, in descending order, were: Se> TME> Germination> Fe> Emergence. Of the 74 loci produced by the 13 selected primers, 71 were polymorphic, ie 96.7% polymorphism, evidencing high genetic divergence. In the genetic diversity of the sapucaia matrices the percentage of polymorphism found in the 20 samples is high (96.7%). The nuts of the 21 sapucaia matrices did not present toxic levels of selenium, macro and micronutrients. The matrices 8 (175.4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and 20 (71.2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) were selected by the amount of manganese and iron in the nuts, respectively. The content of selenium in the nuts of sapucaia ranged from 0.10 (matrix 11) to 32.40  $\mu\text{g g}^{-1}$  (matrix 21), and the matrix 21 was selected because it supplied 225  $\mu\text{g}$  of Se, on average, with a recommendation for consumption  $\frac{1}{4}$  of its nuts. The values of density obtained by X-

ray image analysis were on average 4% different from those obtained in the laboratory. This new methodology makes it possible to determine the density precisely and faster than conventional. The inferior or hilo region and the upper region, where the protrusion of the primary root and the hypocotyl, respectively, present the interrupted tegument, with density around  $0.2 \text{ g cm}^{-3}$ . Sapucaia germination is uneven, slow and reaches a maximum of 63%, with emphasis on matrix 11, with greater vigor.

**Keywords:** Sapucaia, genetic divergence, biometry, selenium, germination, image analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Escala de tons de cinza de acetato de celulose.....21

Figura 2 – Frutos de sapucaia (A). Semente intacta (B). Detalhe do hilo na região menos afilada da semente (C). Semente seccionada ao meio sem defeitos disposta de forma lateral (D) e frontal (E), detalhe do embrião (c) de coloração leitosa no centro do endosperma (b) e o tegumento (a). Semente seccionada ao meio com dessecação do endosperma (F); ausência de endosperma (G); com endosperma deteriorado (H); ausência do embrião (I). Sementes intactas submetidas aos raios X evidenciando as estruturas internas sem defeito (J), com o endosperma malformado (K), com dessecação do embrião (L), com ausência do endosperma (M), com endosperma contaminado e deteriorado (N), com ausência do embrião (O). Semente em fase de germinação (P), com detalhe da protrusão da raiz primária (seta). Plântula normal, com emergência da parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos a partir de sementes com (Q) e sem tegumento (R-S), detalhe da região mais interna do endosperma (d). Poliembria, a partir de uma semente com seis (T) e quatro (Ua) plântulas emergentes. Individualização das plântulas (Ub). Legenda: Barra: A (15 cm); B-P (1 cm) e Q-U (3 cm).....27

Figura 3 – Densidade ( $\text{g cm}^{-3}$ ) das sementes de sapucaia (matriz 4) por escala de cor, obtidas por imagens de raios X. Legenda: Seta preta, indica menor densidade.....31

Figura 4 – Correlação fenotípica entre as características emergência (E), germinação (G), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME), comprimento das sementes (C), largura das sementes (L), espessura das sementes (Esp), relação comprimento e largura (C/L), massa das sementes (M), volume das sementes (V), densidade das sementes determinada em laboratório (DL), densidade das sementes estimada por imagens de raios X (DRX), teor de lignina total no tegumento das sementes (Lig), espessura tegumentar na região da parte aérea (TPA), espessura tegumentar na região da raiz (TR), área do endosperma das sementes (A), teores de selênio (Se), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn) e cobre (Cu) das castanhas de sapucaia.....33

Figura 5 – *Heat map* representando a divergência genética das 21 matrizes de sapucaia baseado nas características germinação (G), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME), comprimento das sementes (C), largura das sementes (L), espessura das sementes (Esp), relação comprimento e largura (C/L), massa das sementes (M), volume das sementes (V), densidade das sementes determinada em laboratório (DL), densidade das sementes estimada por imagens de raios X (DRX), teor de lignina total no tegumento das sementes (Lig), espessura tegumentar na região da parte aérea (TPA), espessura tegumentar na região da raiz (TR), área do endosperma das sementes (A), teores de selênio (Se), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) nas castanhas.....35

Figura 6 – Perfil de amplificação de ISSR detectados em 20 amostras de sapucaia utilizando o *primer* UBC 873 e marcador (M) de 1 kb em gel de agarose 1,2%.....37

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. GERAL .....	14
2.2. ESPECÍFICOS .....	14
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
3.1. A SAPUCAIA.....	15
3.2. DIVERGÊNCIA GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES .....	15
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
4.1. LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	18
4.2. COLETA E BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES DE SAPUCAIA.....	18
4.3. EXPERIMENTO 1: COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E ANÁLISE DE RAIOS X EM SEMENTES DE MATRIZES DE SAPUCAIA .....	18
4.3.1. Biometria .....	18
4.3.2. Emergência .....	19
4.3.3. Análise de extrativos e lignina do tegumento das sementes .....	20
4.3.4. Densidade determinada por imagens de raios X.....	21
4.4. EXPERIMENTO 2: <i>STATUS</i> NUTRICIONAL DE CASTANHAS DE MATRIZES DE SAPUCAIA.....	22
4.5. EXPERIMENTO 3: DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM SAPUCAIA POR MEIO DE MARCADORES ISSR .....	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país megadiversificado, contendo grande parte da biodiversidade mundial. Sua riquíssima flora conta com espécies vegetais que têm benefícios para a saúde, entretanto, não muito utilizadas (OLIVEIRA et al., 2012). O extrativismo de castanhas é a fonte de renda que sustenta milhares de famílias, sendo a principal atividade econômica da região amazônica (SUJII et al., 2013). A castanha do Brasil (*Beetholletia excelsa* H.B.K.) já é conhecida mundialmente, no entanto há outras castanhas brasileiras com potencial de exportação. Dentre estas castanhas, a sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess) é uma espécie de grande porte, com ocorrência na Floresta Atlântica, Floresta Amazônica e encontrada especialmente no sul da Bahia e norte do Espírito Santo (LORENZI, 2008).

A sapucaia apesar de pouco conhecida, é consumida pela população local e animais, identificada como fonte de lipídios, proteínas e nutrientes essenciais (SOUZA, 2008). Dentre estes elementos, tem-se o selênio (Se), que promove muitos benefícios à saúde humana, como a prevenção de hepatopatias, doenças cardiovasculares ou cancerígenas (redução de riscos de câncer de próstata e cólon) (NAVARRO-ALARCOM; CABRERA-VIQUE, 2008). Cardoso et al. (2016) observaram que as selenoproteínas são responsáveis por respostas positivas em idosos com comprometimento cognitivo leve, ao consumirem uma castanha do Brasil por dia. No entanto, a espécie *Lechytis minor* é hiperacumuladora com concentrações de Se maiores que  $4.000 \mu\text{g g}^{-1}$  (NÉMETH; DERNOVICS, 2015).

Inúmeras são as características de cada espécie, como as biométricas, químicas e fisiológicas, que são expressões fenotípicas importantes. A diversidade fenotípica é uma forma de analisar, em maior ou menor grau, a divergência genotípica entre diferentes unidades de amostra, seja população, variedades ou clones (SILVA et al., 2001). A diversidade genética desta espécie ainda é pouco estudada, portanto trabalhos desta natureza contribuem para os programas de melhoramento, pela maior probabilidade de recuperar genótipos superiores por meio das gerações segregantes. Desta forma, pode-se utilizar medidas de dissimilaridade mais empregadas na avaliação da divergência genética, como a distância Euclidiana Média Padronizada (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Como a sapucaia pode ser no futuro próximo uma grande competidora de mercado da atual castanha do Brasil e demais castanhas, é muito importante estudar a

diversidade fenotípica e molecular, biometria, química, germinação e status nutricional, incluindo o selênio de diferentes materiais genéticos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Analisar a diversidade genética fenotípica e marcadores moleculares, o comportamento morfofisiológico e o *status* nutricional de castanhas de sapucaia (*L. pisonis*).

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Analisar a diversidade genética de 21 matrizes de sapucaia baseado em características juvenis;
- Comparar a diversidade genética de 20 matrizes de sapucaia obtida pelas características juvenis com a divergência por meio de marcador entre sequências simples repetidas (ISSR);
- Caracterizar quimicamente as castanhas de 21 matrizes de sapucaia;
- Analisar a utilização de imagens de raios X para estudos da morfologia interna e estimar a densidade de sementes das diferentes matrizes de sapucaia.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A SAPUCAIA

A sapucaia é uma árvore de grande porte, normalmente de 20 a 30 m, mas pode atingir até 50 m de altura e o tronco pode alcançar 0,90 m de diâmetro (LORENZI, 2008). O tronco possui fissuras verticais profundas e a coloração da casca é acinzentada. As folhas são decíduas e, quando novas são vermelhas ou verdes claras, depois se tornando verdes escuras, brotando justamente antes da floração. As flores possuem 3-7 cm de diâmetro e têm pétalas normalmente púrpuras, às vezes brancas, sempre descorando para branco após a queda (MORI; PRANCE, 1990). A floração pode ocorrer junto com o surgimento das novas folhas de cor rosa ou lilás, e por consequência, toda copa adquire uma bela coloração rosa (LORENZI, 2008). O seu sistema de polinização é preferencialmente alógamo, em que as abelhas são os agentes de dispersão do pólen e os morcegos e o homem, das sementes (MORI; PRANCE, 1990; SAMPAIO, 2000).

Os frutos são grandes, pesando de 1 a 2,5 kg, e quando amadurecem liberam as sementes, tipo castanhas, por uma tampa que se solta na parte inferior, que são ricas em proteínas, minerais e vitaminas, que são consumidas por macacos e morcegos. Sua colheita é dificultada tanto pelo porte da árvore quanto pela indeiscência dos frutos (SAMPALIO, 2000; FERRÃO, 2001; DENADAI et al., 2007; SOUZA et al., 2008; CARVALHO et al., 2012).

Dentre as diversas utilidades e importâncias da sapucaia, destacam-se seu uso na indústria madeireira, na produção de cosméticos, no cultivo ornamental, na produção de objetos artesanais e o potencial econômico das suas castanhas (SAMPALIO, 2000; REVILLA, 2002; RIBEIRO, 2010).

#### 3.2. DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares de DNA têm sido muito utilizados nos estudos de diversidade genética e melhoramento de plantas (BORÉM; CAIXETA, 2009). O seu uso aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento, pois permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares de natureza dominante, como o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), têm se popularizado nos estudos genéticos de plantas, por apresentar vantagens como: baixo custo, alta transferibilidade e reprodutibilidade e obtenção de elevado polimorfismo (VIJAYAN, 2005). Para a definição de estratégias de conservação e uso sustentável dos recursos genéticos das espécies nativas, a compreensão dos padrões de distribuição da diversidade é de fundamental importância.

Os marcadores moleculares são capazes de viabilizar a caracterização de grande número de genótipos por meio de procedimentos relativamente simples e rápidos. Nas últimas décadas, tem aumentado o número de marcadores moleculares juntamente com o crescimento de estudos de melhoramento genético, genética de populações e bioinformática. Em consequência, isso tem gerado um imenso progresso no conhecimento aplicável à conservação e manipulação da biodiversidade (SILVA et al., 2014).

Os marcadores moleculares possuem diversas vantagens com relação aos marcadores morfológicos: são fenotipicamente neutros, geram um número praticamente ilimitado de polimorfismo genético, são aplicáveis a qualquer tipo de material vegetal e em qualquer estágio de desenvolvimento e permitem a identificação correta de variedade sem necessitar de muitos caracteres (FALEIRO, 2007).

Um marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores de DNA baseiam-se fundamentalmente nas análises das diferenças em pequenas sequências do DNA entre indivíduos. Diversas técnicas de biologia molecular têm sido empregadas com sucesso para revelar classes distintas de marcadores moleculares. Geralmente, são estas técnicas que dão o nome aos diferentes tipos de marcadores, os quais podem ser de natureza dominante ou codominante (DELGADO, 2006). Os marcadores de DNA são muito úteis no melhoramento genético de plantas, pois têm sido usados em estudos de diversidade genética, melhoramento assistido, mapeamento genético, reconhecimento, isolamento de genes, caracterização e identificação de variações genéticas (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os marcadores ISSR tem alta reprodutibilidade e combinam a maior parte dos benefícios das análises de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites com a universalidade do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Os marcadores ISSR possuem potencial para integração em programas de melhoramento de plantas. Têm sido utilizados na caracterização e manutenção de germoplasma, para estimar a extensão da diversidade genética de diversas espécies, na resolução de problemas relacionados com a filogenia, no mapeamento genômico e em estudos de biologia evolutiva (SOUZA et al., 2012; YU et al. 2014; WONGSAWAD; PEERAPORNPIBAL, 2014).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira (DCFM), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAIE), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), situado no município de Jerônimo Monteiro, ES, Brasil.

### **4.2. COLHEITA E BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES DE SAPUCAIA**

As matrizes de sapucaia (21) foram identificadas na região norte do Espírito Santo, nos municípios de Linhares e Sooretama. O município de Linhares está localizado na latitude 19° 23' 28" S e longitude 40° 04' 20" W, enquanto Sooretama está localizado a latitude 19° 11' 30" S e longitude 40° 05' 46" W. Os frutos, tipo pixídio, foram colhidos das matrizes em fase inicial de deiscência e expostos ao sol para a abertura e liberação das sementes. Posteriormente as sementes foram beneficiadas e levadas ao Laboratório de Sementes Florestais do DCFM/CCAIE/UFES para os estudos

### **4.3. EXPERIMENTO 1: COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E ANÁLISE DE RAIOS X EM SEMENTES DE MATRIZES DE SAPUCAIA**

#### **4.3.1. Biometria**

O estudo biométrico constou das características comprimento, largura, espessura, massa, volume, densidade, área do endosperma e espessura do tegumento das sementes de cada matriz.

Foram separadas 100 sementes aleatoriamente de cada matriz, divididas em quatro repetições, medindo-se: o comprimento entre o ápice e a base, a maior largura e maior espessura de cada semente dentro de cada repetição, com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. Posteriormente foi determinada a

massa de sementes em balança com precisão de 0,0001 g, e o resultado expresso em g semente<sup>-1</sup>. O volume foi determinado em cm<sup>3</sup> pela imersão da semente em recipiente com água destilada sob balança de precisão de 0,0001 g, levando em consideração a densidade da água de 1 g cm<sup>-3</sup> (Princípio de Arquimedes).

A densidade foi determinada pela fórmula  $D = M/V$ , em que  $D$  = densidade da semente (g cm<sup>-3</sup>),  $M$  = massa da semente (g) e  $V$  = volume da semente (cm<sup>3</sup>).

Para a análise da espessura das sementes, separou-se uma amostra de vinte sementes por matriz, à exceção da matriz 10, pela ausência de sementes, para analisar a parte interna das sementes, que foram seccionadas longitudinalmente em uma serra de fita, lixadas manualmente em lixa número 80 e escaneadas em um escâner de alta resolução (1200 ppp) EPSON Perfection V700 Photo/ V750 Pro. As análises das imagens foram feitas pelas medidas da espessura do tegumento na parte aérea (emissão do hipocótilo), na região do hilo (emissão da raiz primária) e na área do endosperma, com o auxílio do programa Image-Pro Plus versão 4.5.

#### 4.3.2. Emergência

As sementes analisadas pela biometria (medições de comprimento, largura e espessura) foram submetidas à desinfestação, por lavagem em água corrente, imersão em álcool 70%, por um minuto, posteriormente em hipoclorito de sódio a 2%, por cinco minutos e em seguida no fungicida Orthocide® a 2%, por cinco minutos. Ao término de cada etapa de desinfestação foi feita uma tríplex lavagem em água destilada, e foram analisados: **teste de emergência** – foi conduzida em bandejas plásticas, utilizando-se quatro repetições de 25 sementes, semeadas no substrato entre areia, esterilizada a 100 °C, por 24 horas, e mantidas em câmaras de germinação tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As regas foram feitas com água destilada com volume correspondente a 60% da capacidade de retenção de água do substrato (BRASIL, 2009). As avaliações foram feitas diariamente para o cálculo da emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE) e tempo médio de emergência (TME, dias). Ao final do teste foi calculada a porcentagem de emergência pela fórmula:  $G = (Gn/25) \times 100$ , em que  $Gn$  é o número de emergência total de cada repetição, fazendo-se a média das repetições para cada matriz (BRASIL, 2009). **Índice de Velocidade de Emergência (IVE)** – foi obtido concomitante com o teste de

emergência, computando-se diariamente o número de sementes que emergiram, e calculado de acordo com Maguire (1962):  $IVE = E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn$ , em que: IVE = índice de velocidade de emergência;  $E_n$  = número de plântulas emergidas computadas desde o primeiro até o último dia de avaliação e  $N_n$  = número de dias transcorridos desde o primeiro até o último dia da emergência.

**Tempo Médio de Emergência (TME)** – foi calculado de acordo com Labouriau (1983):  $TME = \Sigma(n_i.t_i)/\Sigma n_i$ , em que: TME = tempo médio de emergência (dias);  $n_i$  = número de plântulas emergidas no intervalo entre cada contagem; e  $t_i$  = tempo decorrido entre o início da emergência e a i-ésima contagem.

#### 4.3.3. Análise de extrativos e lignina do tegumento das sementes

Os tegumentos das sementes de cada matriz foram retirados, identificados, secos ao ar e triturados em moinho tipo Wiley, conforme a norma da Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI - T 257 om-92, 1992). O material moído foi classificado por peneiras, de forma que as análises foram feitas somente na fração de granulometria suficiente para ficar retida em peneira de 60 “mesh” (0,25 mm).

No Laboratório de Química da Madeira do CCAE/UFES, a análise dos extrativos foi realizada conforme a norma TAPPI 264 om-88 (1992) com adaptações. A partir das amostras de tegumento moído, utilizou-se  $2,0 \pm 0,001$  g da amostra livre de umidade e estas foram alocadas em filtro de vidro sinterizado, porosidade nº 2, e depois inseridas em extrator “Soxhlet” para fazer a extração em acetona por cinco horas.

O produto da extração, uma mistura do solvente com extrativos, foi evaporada em estufa a  $103,0 \pm 2,0$  °C para a remoção do solvente. O resíduo formado pelos extrativos foi então pesado e o teor de extrativos removido pela acetona foi obtido por diferença de massa.

Após a extração em acetona, foi feita a extração em água quente por uma hora e, em seguida, as amostras levadas à estufa a  $103,0 \pm 2,0$  °C para secar e o teor de extrativos determinado pela diferença de massa.

O teor de extrativos totais foi dado pela soma dos extrativos removidos pela acetona e dos removidos pela água quente.

Parte das amostras livres de extrativos,  $0,3 \pm 0,0001$  g de cada matriz, foi submetida à hidrólise com ácido sulfúrico por 60 minutos a  $30,0 \pm 1,0$  °C, autoclavada por 60 minutos e depois filtrada. O sólido retido no filtro é considerado a lignina insolúvel, determinada pela diferença de massa (GOMIDE; DEMUNER, 1986).

O líquido remanescente da filtração da lignina insolúvel foi analisado em espectrofotômetro UV para determinar a lignina solúvel (GOLDSHIMID, 1971).

A lignina total foi obtida por meio da soma da lignina solúvel e da lignina insolúvel.

#### 4.3.4. Densidade determinada por imagens de raios X

Para a obtenção da densidade aparente das sementes das 21 matrizes de sapucaia utilizou-se o equipamento de raios X Faxitron modelo LX-60 do Laboratório de Anatomia, Identificação e Densitometria de Raios X em Madeira, localizado no Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ (Universidade de São Paulo).

Foram expostas à radiação oito sementes por repetição, com quatro repetições por matriz a 70 cm de distância entre a fonte de raios X e as sementes. Estas e uma escala de calibração de acetato de celulose, referencial de densidade, foram inseridas no compartimento blindado do equipamento de raios X, seguindo-se a operação de calibração e de leitura automática (30 kV, 19 segundos), gerando-se imagens digitais das sementes, juntamente com a escala de calibração de ultra contraste e resolução na tela do monitor. Estas foram salvas em formato TIF (FAXITRON, 2009) e analisadas com software Arcmap® por comparação pixel a pixel (resolução 1 cm) com a escala de tons de cinza do acetato de celulose, a partir da qual desenvolveram-se 13 classes de espessura: 0,250; 0,485; 0,985; 1,490; 1,990; 2,470; 2,960; 3,450; 3,940; 4,430; 4,885; 5,180 e 5,130 mm (Figura 1).



Figura 1 – Escala de tons de cinza de acetato de celulose.

As densidades aparentes das 21 matrizes de sapucaia foram calculadas a partir da Equação 1.



$$D_s = \frac{\sum[(d_{classe} \cdot Ap_{Rx}) \cdot Np_{classe}]}{Np_{total Rx}} \quad (1)$$

Em que,  $D_s$  = densidade aparente da semente ( $\text{g cm}^{-3}$ );  $Ap_{Rx}$  = área do pixel da imagem radiografada ( $1 \text{ cm}^2$ );  $Np_{classe}$  = número de pixels da classe;  $Np_{total Rx}$  = número total de pixels da imagem radiografada.

$$d_{classe} = \frac{[(Eac_{classe} \cdot Ap_{escala}) \cdot D_{ac}]}{E_{semente}}$$

Em que,  $Eac_{classe}$  = espessura do acetato de celulose da classe (cm);  $Ap_{escala}$  = área do pixel da imagem da escala ( $1 \text{ cm}^2$ );  $D_{ac}$  = densidade do acetato de celulose ( $1,274 \text{ g cm}^{-3}$ );  $E_{semente}$  = média da espessura das sementes da matriz.

#### 4.4. EXPERIMENTO 2: STATUS NUTRICIONAL DE CASTANHAS DE MATRIZES DE SAPUCAIA

Para a análise nutricional, foram utilizadas sementes sem tegumento de cada matriz de sapucaia, à exceção da matriz 4, pela insuficiência de sementes. As sementes foram trituradas em liquidificador de alta rotação (18.000 rpm) e os grânulos resultantes foram levados ao Laboratório de Recursos Hídricos e Solos do CCAE/UFES e usados para a extração de selênio, macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu e Mn), de acordo com a metodologia descrita por Silva (2009).

O nitrogênio total foi extraído de 0,20 g de cada matriz, por digestão sulfúrica, passando pelo destilador de nitrogênio, depois titulada na solução de HCl 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  e determinado pelo método micro-Kjeldahl. A extração do P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn e Zn foi pela digestão nitroperclórica de 0,50 g de amostras de cada matriz, formando um extrato concentrado. Deste extrato, foi diluído uma parte em água deionizada e acrescentado ácido ascórbico e solução 725 para a leitura do P em espectrofotômetro (725 nm). Para o enxofre foi diluído e adicionado solução tampão e reagente de trabalho, em seguida foi lido em espectrofotômetro (420 nm). Para o K, a leitura do extrato foi em fotômetro de chama. Para a leitura do Ca e Mg foi adicionado cloreto de estrôncio e depois submetido ao espectrofotômetro de

absorção atômica. Neste mesmo aparelho também foram analisados os demais nutrientes (Se, Cu, Mn e Zn), em seus respectivos comprimentos de ondas.

#### 4.5. EXPERIMENTO 3: DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM SAPUCAIA POR MEIO DE MARCADORES ISSR

##### 4.5.1. Extração do DNA genômico

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal, do CCAE/UFES, em Alegre-ES.

O DNA genômico foi extraído de 20 amostras de sapucaia, cada amostra consistindo em um bulk de castanhas moídas (sementes sem o tegumento) de 20 matrizes. Logo, as amostras representam progênies de cada uma das matrizes individualizadas. Estas castanhas foram identificadas e armazenadas à temperatura de  $4 \pm 2$  °C, até a extração do DNA.

Foi utilizado o protocolo para extração de DNA de sementes adaptado de McDonald et al. (1994). Amostras de 50 mg foram maceradas em tubos de 2,0 mL contendo cinco esferas de vidro (3 mm), por 60 segundos, com o auxílio do Magnalyzer (Roche). Em seguida foi adicionado o tampão de extração: Tris-HCl pH 7,5, na concentração de 200 mM, NaCl a 288 mM, EDTA a 25 mM, SDS (dodecilsulfato de sódio) à 0,5% e Beta-mercapto à 0,2%, e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Para a eliminação das proteínas foi utilizado 10 µL de proteinase K e 10 µL de CaCl<sub>2</sub> a 1 mM, sendo feita a precipitação em isopropanol, seguida da lavagem do pellet em álcool 70%. Para a eliminação do RNA, o pellet foi ressuscitado em 300 µL de TE (Tris.HCl pH 8 na concentração de 10 mM + EDTA pH 8 a 1 mM) contendo 40 µg µL<sup>-1</sup> de RNase A, seguido da precipitação em isopropanol e, novamente, ressuspensão em 100 µL de TE.

A quantidade e a qualidade do DNA obtido na extração foram mensuradas com o auxílio do equipamento Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8% e, TBE 1x (Tris-Borato-EDTA), corado em banho de brometo de etídio (50 µL L<sup>-1</sup>), por 15 minutos, utilizando-se fotodocumentador Biorad Gel Doc<sup>TM</sup> XR.

#### 4.5.2. Reação de amplificação do DNA e eletroforese

Foram testados 96 *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá, quanto à amplificação e o nível de polimorfismo gerado. Sendo selecionados 13 *primers* para a caracterização molecular das 20 amostras: UBC 807, UBC 826, UBC 841, UBC 842, UBC 844, UBC 845, UBC 852, UBC 853, UBC 856, UBC 867, UBC 868, UBC 873 e UBC 880, com a temperatura de anelamento de 50 °C para todos os *primers*, à exceção de UBC 807 (52 °C), UBC 826 (56 °C), UBC 845 (46 °C) e UBC 856 (59 °C).

As reações de amplificação foram realizadas em concentrações utilizadas para um volume final de reação de 15 µL: tampão 1,0x, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,8 µM do *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega®) e 7 ng µL<sup>-1</sup> de DNA genômico (0,32 mg mL<sup>-1</sup> de BSA e 1 mM de DTT). Foi usado um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®) com capacidade para 96 amostras.

As reações envolveram repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão seguindo-se os seguintes parâmetros: uma fase inicial de desnaturação a 94 °C por quatro minutos; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento a uma temperatura dependente do *primer* durante um minuto, extensão a 72 °C por um minuto e uma etapa de extensão final a 72 °C, por cinco minutos.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,2% com tampão 1X TBE, por meio de eletroforese submetida a 110 volts durante quatro horas. Os padrões de bandas foram visualizados corando-se os géis em banho de brometo de etídio (50 µL L<sup>-1</sup>) por 15 minutos, utilizando-se fotodocumentador Biorad Gel Doc™ XR.

As fotografias dos géis foram analisadas para a determinação do número de bandas por meio de avaliação visual, comparando-as com o marcador molecular DNA Ladder 100 kb (Kasvi®).

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e teste F em nível de 5% de probabilidade e as médias submetidas ao teste de agrupamento de médias de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Foi feita a distância Euclidiana média padronizada como medida de dissimilaridade e o gráfico *Heat Map*, que é a representação dos dados em mapa de calor. Foi feita a contribuição relativa das características emergência, germinação, índice de velocidade e tempo médio de emergência, comprimento, largura, espessura, relação comprimento e largura das sementes, espessura do tegumento na parte aérea e da raiz, massa, volume, densidade, lignina do tegumento das sementes e os macro e micronutrientes para a divergência genética pelo método de Singh (1981) e a correlação fenotípica dessas características.

As bandas obtidas no procedimento de amplificação foram codificadas, resultando em uma matriz de valores binários com atribuição de valor 1 (um) para presença de bandas ou 0 (zero) para a ausência delas. As estimativas de dissimilaridade genética ( $d_{ii'}$ ) foram feitas de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de coincidência simples, sendo posteriormente organizadas em matrizes para aplicação na análise de agrupamento por meio de ligação entre grupos (UPGMA). As análises foram realizadas com o auxílio do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de frutos de sapucaia no ano deste estudo foi menor comparado ao ano anterior, por isto algumas análises nas sementes não foram possíveis com todas as matrizes pela baixa quantidade obtida (dados não apresentados). Essa alternância de produção de frutos e sementes é facilmente observada em espécies da família Lecythidaceae, como na castanheira do Brasil (*B. excelsa*), variando tanto entre populações quanto indivíduos e a maioria não produz frutos todos os anos. Nos anos de maior produção, um castanhal de *B. excelsa* chega a produzir 52 vezes mais em relação aos anos de menor produção (TONINI; PEDROSO, 2014).

As variações encontradas entre as matrizes podem ser visualizadas em várias características, como nos frutos de sapucaia (Figura 2A). Verificam-se sementes intactas (Figura 2B, com hilo em C), sementes seccionadas ao meio evidenciando suas estruturas e defeitos ocorridos (Figura 2D-I). Com o uso dos raios X verifica-se em algumas sementes de sapucaia as estruturas internas intactas (Figura 2J) e outras malformadas (Figura 2K-O). O baixo número de sementes produzidas e a morfologia alterada das sementes podem estar relacionados a vários fatores, dentre estes às barreiras na polinização, como as pré-zigóticas (inibição da germinação do grão de pólen no estigma e do crescimento do tubo polínico) e, as pós-zigóticas (aborto do embrião devido à degeneração do endosperma), respectivamente, a exemplo do que ocorre dentro do gênero *Kalanchoë* (KULIGOWSKA et al., 2015).

Nas sementes intactas de sapucaia, verifica-se após o processo germinativo, estádios de desenvolvimento das sementes, iniciando com a protrusão da raiz primária (Figura 2P) e culminando em plântulas poliembriônicas (Figura 2Q-U). A poliembrião é uma característica importante a considerar que a sapucaia é uma espécie que apresenta limitações no processo germinativo, em que a emissão de mais de uma plântula por semente pode proporcionar a vantagem da multiplicação destes outros indivíduos, que naturalmente seriam descartados.

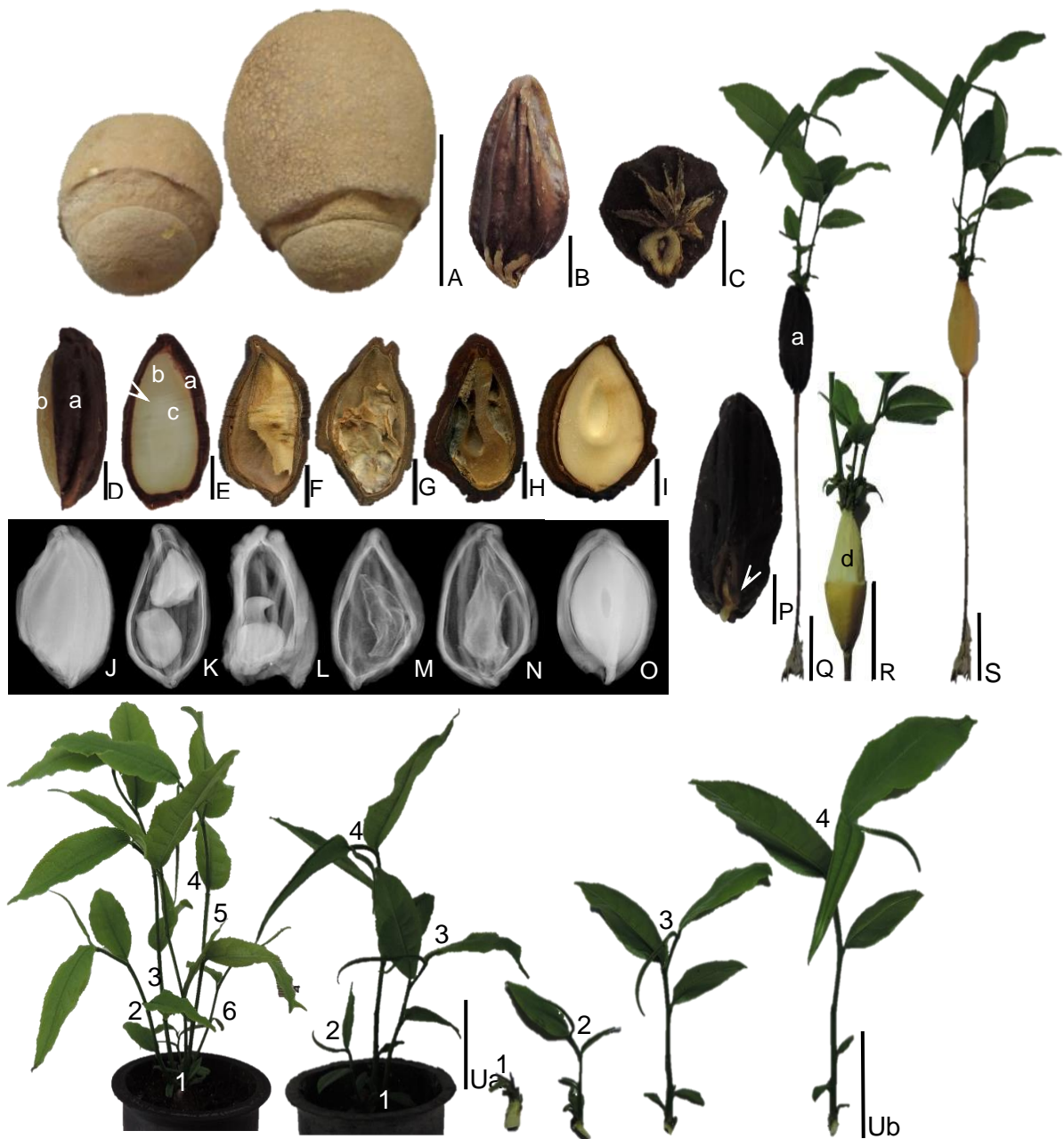


Figura 2 – Frutos de sapucaia (A). Semente intacta (B). Detalhe do hilo na região menos afilada da semente (C). Semente seccionada ao meio sem defeitos disposta de forma lateral (D) e frontal (E), detalhe do embrião (c) de coloração leitosa no centro do endosperma (b) e o tegumento (a). Semente seccionada ao meio com dessecação do endosperma (F); ausência de endosperma (G); com endosperma deteriorado (H); ausência do embrião (I). Sementes intactas submetidas aos raios X evidenciando as estruturas internas sem defeito (J), com o endosperma malformado (K), com dessecação do embrião (L), com ausência do endosperma (M), com endosperma contaminado e deteriorado (N), com ausência do embrião (O). Semente em fase de germinação (P), com detalhe da protrusão da raiz primária (seta). Plântula normal, com emergência da parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos a partir de sementes com (Q) e sem tegumento (R-S), detalhe da região mais interna do endosperma (d). Poliembria, a partir de uma semente com seis (T) e quatro (Ua) plântulas emergentes. Individualização das plântulas (Ub). Legenda: Barra: A (15 cm); B-P (1 cm) e Q-U (3 cm).

Os maiores valores de porcentagens de germinação (50%), emergência (50%) e IVE (0,2144) foram obtidos na matriz 16, com TME de 62 dias. Entretanto, não diferiu quanto às características germinação (63%) e emergência (40%) para a matriz 11 (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias das características germinação (G, %), emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME, dias), comprimento das sementes (C, mm), largura das sementes (L, mm), espessura das sementes (Esp, mm), relação comprimento e largura (C/L), massa das sementes (M, g), volume das sementes (V,  $\text{cm}^3$ ), densidade das sementes determinada em laboratório (DL,  $\text{g cm}^{-3}$ ), densidade das sementes estimada por imagens de raios X (DRX,  $\text{g cm}^{-3}$ ), teor de lignina total no tegumento das sementes (Lig, %), espessura tegumentar na região da parte aérea (TPA, mm), espessura tegumentar na região da raiz (TR, mm), área do endosperma das sementes (A,  $\text{cm}^2$ ), teores de selênio (Se,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), nitrogênio (N, %), fósforo (P, %), potássio (K, %), cálcio (Ca, %), magnésio (Mg, %), enxofre (S, %), zinco (Zn,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), ferro (Fe,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), manganês (Mn,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e cobre (Cu,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) das castanhas de sapucaia.

Matriz	Características								
	G	E	IVE	TME	C	L	E	C/L	M
1	6d	4d	0,0135c	41b	39,53d	22,99c	19,01b	1,72d	5,44d
2	18c	8d	0,0253c	97a	47,54a	26,62a	21,26a	1,79a	5,90c
3	0d	0d	0,0000c	0b	38,92e	22,26c	17,63c	1,75e	5,15d
4	5d	4d	0,0171c	51b	44,67c	22,94c	18,06c	1,95d	3,15f
5	15c	6d	0,0196c	63a	37,18f	18,53e	14,99e	2,00f	1,91g
6	20c	11c	0,0289c	74a	43,76c	25,44b	20,87a	1,72b	6,35c
7	1d	1d	0,0024c	26b	47,92a	26,46a	20,77a	1,81a	7,61a
8	41b	30b	0,1254b	72a	37,84e	21,02d	15,66e	1,80f	4,51e
9	25c	13c	0,0371c	89a	38,90e	21,87c	18,07c	1,78e	5,33d
10	54a	33b	0,1180b	76a	46,34b	23,68c	19,18b	1,96c	7,57a
11	63a	40a	0,1412b	78a	45,89b	21,59c	17,33d	2,13e	6,18c
12	1d	1d	0,0027c	24b	34,75g	20,61d	15,60e	1,68f	4,22e
13	33b	33b	0,1438b	63a	43,99c	25,01b	20,81a	1,76b	7,40a
14	11d	11c	0,0337c	94a	46,33b	24,65b	21,00a	1,88b	7,53a
15	13c	13c	0,0467c	80a	40,13d	26,38a	21,59a	1,52a	5,32d
16	50a	50a	0,2144a	62a	38,39e	21,96c	16,81d	1,75e	4,91d
17	41b	41a	0,1441b	70a	47,89a	26,35a	20,91a	1,82a	6,87b
18	10d	10c	0,0314c	87a	46,11b	25,60b	21,06a	1,80b	6,78b
19	21c	21c	0,0693c	80a	45,14c	22,66c	18,97b	1,99d	5,34d
20	23c	23c	0,0684c	86a	39,93d	27,11a	21,31a	1,50a	7,03b
21	43b	43a	0,2076a	51b	45,44c	24,32b	19,37b	1,87c	6,96b
CV(%)	79,8	84,0	95,4	38,9	9,5	9,8	11,0	8,25	26,1
Matriz	V	DL	DRX	LIG	TPA	TR	A	Se	N
1	7,09c	0,77e	0,76e	55,81d	3,12a	1,57b	3,67e	2,40f	3,17e
2	8,26b	0,71f	0,69f	54,87d	3,33a	2,00b	4,61a	1,71f	3,44d
3	5,95d	0,87d	0,90c	57,86c	2,40b	2,42a	3,52f	6,50d	3,59c
4	5,82d	0,54g	0,53h	51,86e	3,81a	1,84b	3,79e	0,90g	-
5	3,43g	0,56g	0,62g	49,87e	2,86a	2,48a	1,98j	6,14d	3,99a
6	7,95b	0,80e	0,79e	54,89d	2,29b	1,56b	4,25c	0,50g	3,52d
7	9,25a	0,83e	0,76e	54,96d	3,63a	2,79a	4,04d	0,20g	3,255e
8	5,05e	0,89d	0,92c	55,95d	2,67b	1,76b	3,34g	2,36f	3,78b
9	6,46d	0,82e	0,88d	57,33c	3,08a	1,68b	3,92d	3,14e	3,67c

10	9,55a	0,80e	0,83d	53,56e	-	-	-	0,11g	3,82b
11	7,69b	0,80e	0,87d	54,17d	2,00b	2,66a	4,45b	0,10g	3,85b
12	5,24e	0,81e	0,86d	51,94e	2,90a	1,97b	2,80h	0,00g	3,57c
13	7,60b	0,97b	0,95b	60,72b	2,10b	1,89b	4,57a	2,22f	2,77h
14	8,21b	0,93c	0,93c	61,91a	3,02a	2,99a	4,75a	2,45f	3,07f
15	5,62d	0,94c	0,90c	58,69b	3,07a	2,08b	3,16g	1,77f	2,74h
16	4,71f	1,04a	1,08a	57,11c	2,60b	1,70b	2,55i	7,05d	3,01f
17	7,03c	0,97b	0,96b	57,22c	3,57a	1,57b	4,04d	21,16b	2,91g
18	7,45c	0,91d	0,83d	57,64	1,90b	1,85b	4,20c	3,93e	2,75h
19	5,88d	0,90d	0,90c	62,27a	3,06a	1,71b	3,58f	1,45f	3,48d
20	7,15c	0,98b	0,97b	64,00a	2,31b	2,20a	3,77e	13,36c	2,94g
21	7,18c	0,97b	0,93c	61,19b	2,11b	1,26b	4,35b	32,40a	3,65c
CV(%)	22,4	15,1	14,6	6,5	20,2	22,8	19,2	153,3	12,0
Matriz	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Fe	Mn	Cu
1	0,90	0,93d	0,13d	0,27e	0,29c	47,74e	24,26f	41,35i	30,54c
2	1,08	1,35b	0,12d	0,34b	0,32b	62,79b	18,46g	65,56c	43,26a
3	1,03	0,69e	0,21c	0,29d	0,29c	58,32c	28,66e	83,75b	33,24c
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,52	2,59a	0,16d	0,40a	0,35a	70,90a	22,70f	61,01d	46,26a
6	0,96	0,74e	0,20c	0,27e	0,32b	44,44f	6,96i	47,24f	24,36d
7	1,07	0,84d	0,17d	0,27d	0,23e	56,77c	12,32h	32,02l	35,90b
8	1,22	0,85d	0,24c	0,33c	0,22e	55,97c	23,79f	175,48a	39,86b
9	1,12	0,87d	0,15d	0,30d	0,31b	50,50d	24,33f	39,54j	46,11a
10	1,17	1,08c	0,21c	0,36b	0,30c	71,96a	23,38f	46,29g	44,64a
11	1,12	1,08c	0,21c	0,322c	0,29c	62,50b	20,28g	44,36h	26,41d
12	1,02	1,01c	0,15d	0,29d	0,28d	43,23f	11,96h	25,11m	19,06d
13	0,82	0,46f	0,19c	0,26e	0,34a	40,30g	6,52i	26,76m	23,69d
14	0,95	0,92d	0,29b	0,27e	0,30c	46,47e	40,00d	48,98f	27,40d
15	0,98	1,41b	0,31b	0,29d	0,29c	46,18e	53,16b	25,49m	32,61c
16	1,00	0,98c	0,36a	0,25e	0,27d	46,94e	52,38b	40,99i	39,64b
17	0,91	0,55f	0,27b	0,25e	0,30c	29,39i	36,74d	21,42n	34,78b
18	0,91	0,59f	0,31b	0,28d	0,26d	32,72h	45,09c	34,76k	25,21d
19	1,17	0,70e	0,35a	0,29d	0,30c	50,13d	41,88c	17,77o	36,14b
20	0,96	0,53f	0,36a	0,22f	0,28d	40,31g	71,21a	42,33i	37,35b
21	1,01	0,47f	0,29b	0,25e	0,13f	34,18h	16,94g	54,47e	25,92d
CV(%)	14,5	50,4	34,0	14,3	17,0	23,8	58,8	69,4	24,2

As médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

A germinação da sapucaia foi desuniforme, lenta e atingiu no máximo 63% (matriz 11), não diferindo das matrizes 10 (matriz 54%) e 16 (50%) (Tabela 1). Alguns fatores contribuíram para os baixos valores de germinação, como os defeitos observados nas sementes (Figura 2F-O); a contaminação por bactérias dos endospermas, que são ricos em lipídeos e proteínas (VALLILO et al., 1998) no qual serviram de alimento para este micro-organismo; e uma possível dormência. É comum a dormência em espécies florestais, pois em condições naturais é um mecanismo de sobrevivência da espécie, possibilitando que a germinação ocorra apenas sob condições adequadas para o estabelecimento das plântulas (FINCH-



SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006). Entretanto, torna-se um problema para a produção de mudas, pela desuniformidade de germinação e perdas das sementes por deterioração (RODRIGUES et al., 2008), devido ao baixo vigor. Na Floresta Atlântica do Brasil, Souza et al. (2015) verificaram que a dormência física e fisiológica estão presentes em proporções iguais; a probabilidade de uma espécie apresentar dormência física ou fisiológica dobra se for encontrada em um ambiente ensolarado; a dormência física é maior no grupo não clímax, e a dormência fisiológica ocorre em proporções semelhantes em grupos não climácicos e clímax; se as sementes são autóctones, então a probabilidade de que tenham dormência física é cerca de oito vezes maior; as espécies com dormência fisiológica apresentam sementes com massas menores do que aquelas com sementes fisicamente dormentes.

As características biométricas das sementes de sapucaia foram divergentes, com formações de até 10 agrupamentos para a área do endosperma. Para esta característica, os valores variaram de 1,98 (matriz 5) a 4,75 cm<sup>2</sup> (matriz 14), o que representa 58,3% de diferença. As características comprimento, largura, espessura e relação comprimento e largura das sementes foram maiores nas matrizes 2, 7; 2, 7, 15, 17, 20; 2, 6, 7, 13, 14, 15, 17, 18, 20 e 2, 7, 15, 17, 20 com médias de 47,73; 26,58 e 21,06 mm e 1,68, respectivamente, com destaque para as matrizes 2 e 7. A característica espessura do tegumento das sementes tanto na extremidade do eixo hipocotiledonar (parte aérea) quanto da extremidade basal (raiz primária), formou apenas dois grupos distintos, com diferenças entre os de maior e menor valores de aproximadamente 1,0 e 0,84 mm, respectivamente. Isto indica que a menor barreira física imposta em uma das extremidades à entrada de água ou à saída da parte aérea da plântula possa ter favorecido a força da protrusão da raiz primária e/ou a emergência das plântulas.

A maior densidade das sementes de sapucaia foi encontrada na matriz 16 (1,04 g cm<sup>3</sup>) (Tabela 1). Os valores de densidade obtidos pela análise de imagens de raios X foram em média 4% diferentes aos obtidos em laboratório. Esta nova metodologia possibilita a determinação da densidade de forma precisa e mais rápida à convencional. Na Figura 3 vê-se a variação da densidade de acordo com a coloração em cada região da semente. Nota-se que as colorações mais próximas ao branco correspondem, na maior parte, aos endospermas, que é responsável pelo

aumento da densidade da semente. A densidade no tegumento é mais variável, observando-se pontos cuja densidade é 0,035 e outros com até 1,511 g cm<sup>-3</sup>.

A região inferior ou do hilo e a região superior, locais onde ocorrem a protrusão da raiz primária e do hipocótilo, respectivamente, apresentam o tegumento interrompido, com densidade em torno de 0,2 g cm<sup>-3</sup> (Figura 3). Inclusive no hilo (Figura 3, seta preta) e no ápice, verificam-se menores densidades, caracterizando regiões mais porosas, o que facilita a entrada de água para o interior das sementes. Além disso, a redução da densidade pode ser uma evolução da espécie para facilitar o direcionamento das estruturas (radícula e hipocótilo) para estes pontos facilitando o rompimento do tegumento, o que resulta em menor gasto energético para os processos de germinação e emergência da plântula. Por outro lado, verifica-se regiões menos densas (Figura 3, seta branca) pelo não preenchimento do endosperma na semente, o que não é adequado pois implica na redução de fonte nutritiva ao embrião e, do produto comercial, a castanha.

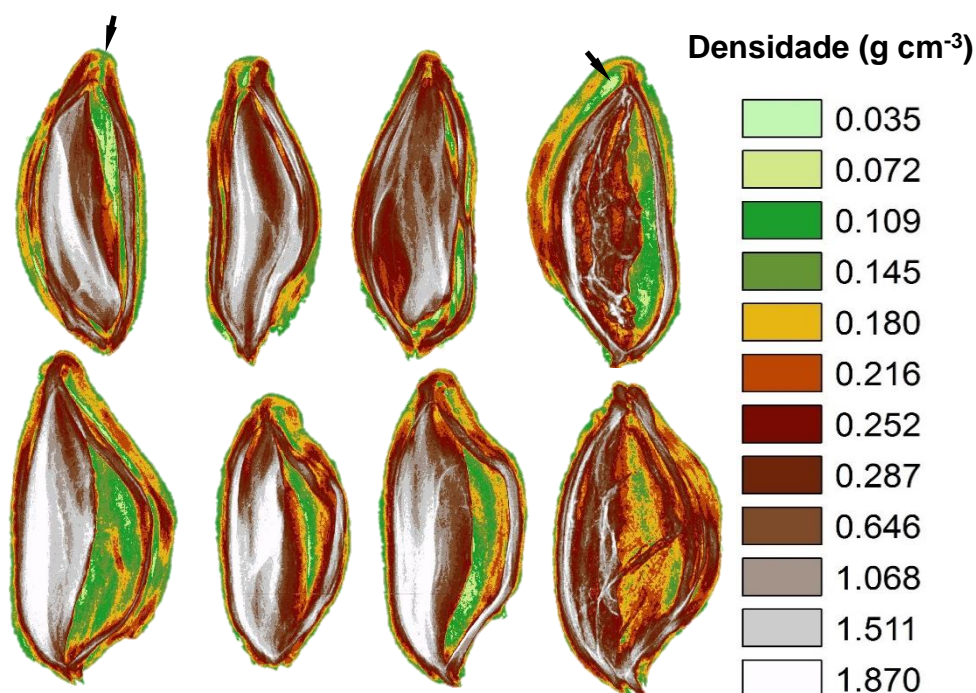


Figura 3 - Densidade (g cm<sup>-3</sup>) das sementes de sapucaia por escala de cor, obtidas por imagens de raios X. Legenda: Seta preta, indica menor densidade.

O teor de selênio nas castanhas de sapucaia variou de 0,10 (matriz 11) a 32,40 µg g<sup>-1</sup> (matriz 21) (Tabela 1). Na castanha do Brasil foi encontrado valores de Se que variam entre 5,8-169,9 µg g<sup>-1</sup> (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

As plantas requerem grandes quantidades dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), isto é, maior que 0,1% de sua massa seca de cada nutriente, sendo estes essenciais para que uma planta complete seu ciclo de vida (MAATHUIS, 2009). Não são essenciais somente para as plantas, visto que os macronutrientes também são imprescindíveis para a alimentação humana.

As quantidades máximas de nitrogênio e fósforo encontradas foram de 3,99 e 1,52%, respectivamente, ambos na matriz 5, com o coeficiente de variação considerado médio (PIMENTEL-GOMES, 2009), sugerindo uma certa diferença entre as matrizes para estes nutrientes. Tanto o N quanto o P são indispensáveis para a síntese de ácidos nucleicos e metabólitos secundários (AMTMANN; ARMENGAUD, 2009), sendo essenciais para o desenvolvimento e crescimento das plantas e humanos. A quantidade máxima de potássio foi encontrada na matriz 5 (2,59%, que é equivalente a 25,9 mg g<sup>-1</sup>), que é menor ao encontrado por Vallilo et al. (1998) em sementes de sapucaia (46,4 mg g<sup>-1</sup>). A matriz 5 também obteve as maiores quantidades de S e Mg, entretanto este último mineral em quantidades muito abaixo do recomendado, uma vez que para homens e mulheres a recomendação é de 420 e 320 mg por dia, respectivamente (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006), e uma castanha da matriz 5 fornece 7,64 mg de Mg, pois multiplica-se a massa da semente (1,91g) pela concentração do nutriente 4 mg g<sup>-1</sup> de Mg (equivalente a 0,4%).

Os micronutrientes estão envolvidos em todas as funções metabólicas e celulares das plantas (HÄNSCH; MENDEL, 2009), por isto é de extrema importância. A quantidade de ferro na matriz 8 (71,2 µg g<sup>-1</sup>) e manganês na 20 (175,4 µg g<sup>-1</sup>) foi muito maior ao encontrado por Vallilo et al. (1998) que foi de 14,2 e 91,0 µg g<sup>-1</sup>, entretanto fornecendo em média 3,75% da ingestão diária de ferro para adultos tanto homens e mulheres, o que é muito pouco e 34,3 e 43,8% de manganês para homens e mulheres, respectivamente (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006). Ainda segundo estes autores, a maior quantidade de Zn (70,90 µg g<sup>-1</sup>) e Cu (46,26 µg g<sup>-1</sup>), encontrada na matriz 5, fornecem média de 1,46 e 9,81%, respectivamente, do consumo recomendado diário destes nutrientes, o que é muito pouco. Recomenda-se, então, estudar outras matrizes a fim de encontrar castanhas mais nutritivas.

Nota-se uma correlação positiva moderada entre a densidade das sementes e sua emergência de acordo com a correlação de Levis (1987). A correlação do selênio com o zinco (Zn) e com o enxofre (S) é negativa, moderada (Figura 4).

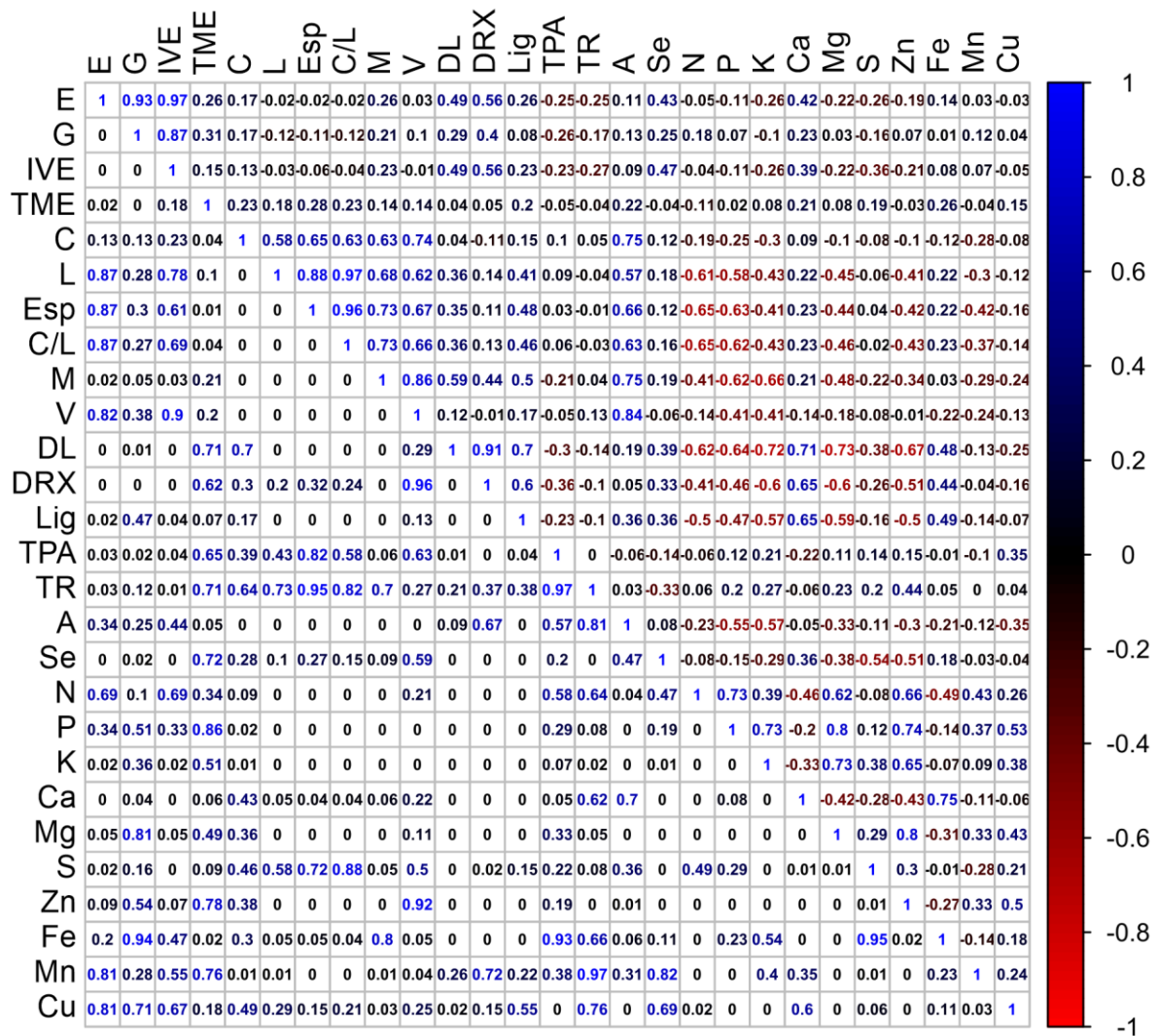


Figura 4 – Correlação fenotípica entre as características emergência (E), germinação (G), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME), comprimento das sementes (C), largura das sementes (L), espessura das sementes (Esp), relação comprimento e largura (C/L), massa das sementes (M), volume das sementes (V), densidade das sementes determinada em laboratório (DL), densidade das sementes estimada por imagens de raios X (DRX), teor de lignina total no tegumento das sementes (Lig), espessura tegumentar na região da parte aérea (TPA), espessura tegumentar na região da raiz (TR), área do endosperma das sementes (A), teores de selênio (Se), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn) e cobre (Cu) das castanhas de sapucaia.

O Se apresentou correlação negativa com o Zn e o S, isto sugere uma bioindisponibilidade destes na presença do Se. A correlação negativa do Se com o S pode ser explicada por serem quimicamente semelhantes e metabolizados por meio dos mesmos mecanismos. No caso de uma planta acumuladora de Se, a relação Se/S é maior, sugerindo a preferência por Se em detrimento ao S pelos transportadores especializados (PILON-SMITS et al., 2009). Outra explicação, é que o Se não se encontra em concentrações indicadoras de estresse, como observado

por Gupta e Gupta (2016) em *Brassica juncea* L., em que o aumento das concentrações de Se causou a peroxidação lipídica, inibiu o crescimento, aumentou concomitantemente os moduladores de estresse (prolina, cisteína, SOD, CAT), juntamente com fatores de transcrição relacionados ao enxofre (LAST, APS, APR, GR, OASL, MT-2, PCS).

Em humanos, a deficiência do Se implica na patogênese de várias doenças crônicas, principalmente em idosos, pois há um declínio de selênio sérico com a idade (LETSIOU et al., 2008) e a suplementação deste nutriente melhora a resposta cognitiva em idosos com comprometimento cognitivo leve, além de desempenhar um importante papel antioxidante por meio das selenoproteínas (CARDOSO et al., 2016). Além disso, a suplementação de Se reduz a ocorrência e até a mortalidade total de vários cânceres (KATO et al., 2010).

Entretanto há uma estreita diferença entre a deficiência e a toxicidade deste elemento em mamíferos (QUINN et al., 2011). A dose diária recomendada de Se é de 55 µg, com ingestão máxima tolerada de 400 µg de Se para adolescentes e adultos, independente do sexo, e gestantes (IOM, 2000). Consumindo-se uma castanha das matrizes 17, 20 ou 21 supre a quantidade diária necessária de Se para um adolescente ou adulto, isto porque fornecem 21,16; 13,26 e 32,40 µg de Se por grama de castanha, que multiplicado pelas suas massas de uma castanha, resultam em 145; 93 e 225 µg de Se em uma castanha das respectivas matrizes. Observa-se que ¼ de uma castanha da matriz 21 já supre a dose diária recomendada de Se, sendo mais vantajosa às demais, considerando o elevado preço das castanhas.

Percebe-se a oscilação da quantidade de selênio de uma matriz para a outra. Este resultado também é divergente e inferior ao encontrado por Vallilo et al. (1998), com média de 280 µg g<sup>-1</sup> de Se para as castanhas de Santa Rita do Passa Quatro-SP. Um dos fatores que causa esta variabilidade é a quantidade de Se no solo, que é também responsável pela oscilação deste nutriente em folhas e flores (QUINN et al., 2011).

Quanto à divergência genética fenotípica, não ficou evidente um padrão entre as matrizes na Figura 5, isto é, as características fisiológicas, biométricas e nutricionais das 21 matrizes não são similares, reforçando a divergência entre as mesmas. Contudo, a quantidade de potássio e fósforo na matriz 5, manganês na 8 e selênio na 21, fizeram com que estas matrizes fossem ainda mais divergentes em relação às demais.

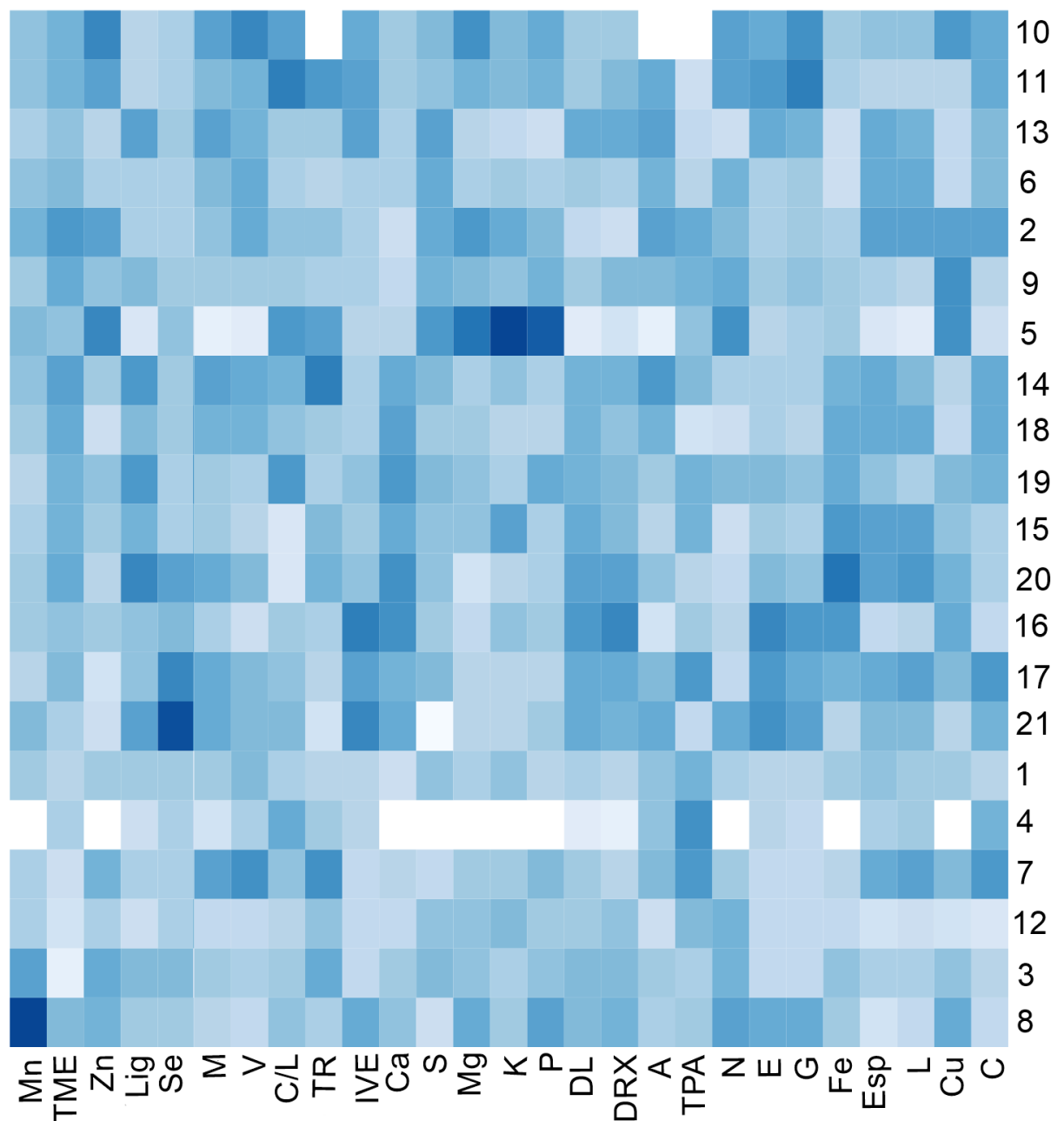


Figura 5 – *Heat map* representando a divergência genética das 21 matrizes de sapucaia baseado nas características germinação (G), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME), comprimento das sementes (C), largura das sementes (L), espessura das sementes (Esp), relação comprimento e largura (C/L), massa das sementes (M), volume das sementes (V), densidade das sementes determinada em laboratório (DL), densidade das sementes estimada por imagens de raios X (DRX), teor de lignina total no tegumento das sementes (Lig), espessura tegumentar na região da parte aérea (TPA), espessura tegumentar na região da raiz (TR), área do endosperma das sementes (A), teores de selênio (Se), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) nas castanhas.

As características que mais contribuíram para a divergência genética em ordem decrescente foram o Mn>TME>Germinação>Fe>Emergência (Tabela 2).

Tabela 2 – Contribuição relativa das características para a diversidade genética pelo método de Singh (1981).

Características	S.j	Valor (%)
Germinação	148286	12,1181
Emergência	105516	8,6229
Índice de velocidade de emergência	1,92692	0,0002
Tempo médio de emergência	266752,3	21,7992
Comprimento	7032,535	0,5747
Largura	2314,386	0,1891
Espessura	1868,997	0,1527
Comprimento/Largura	9,3597	0,0008
Massa	960,8397	0,0785
Volume	976,2516	0,0798
Densidade real	7,0189	0,0006
Densidade por raios X	6,6125	0,0005
Lignina	5759,053	0,4706
Espessura do tegumento da parte aérea	128,1103	0,0105
Espessura na região do hilo	83,80129	0,0068
Área do endosperma	209,9563	0,0172
Selênio	27042,12	2,2099
Nitrogênio	64,81828	0,0053
Fósforo	9,334198	0,0008
Potássio	88,41886	0,0072
Cálcio	2,560648	0,0002
Magnésio	0,698695	0,0001
Enxofre	0,942925	0,0001
Ferro	116609,7	9,5294
Zinco	55996,41	4,5761
Cobre	26453,83	2,1618
Manganês	457495,3	37,3869

Quanto à diversidade molecular, para as 20 amostras das matrizes de sapucaia, os 13 *primers* de ISSR selecionados para a amplificação dos fragmentos de DNA geraram 74 locos (bandas). Na Figura 6 vê-se o perfil de bandas do *primer* UBC 873.

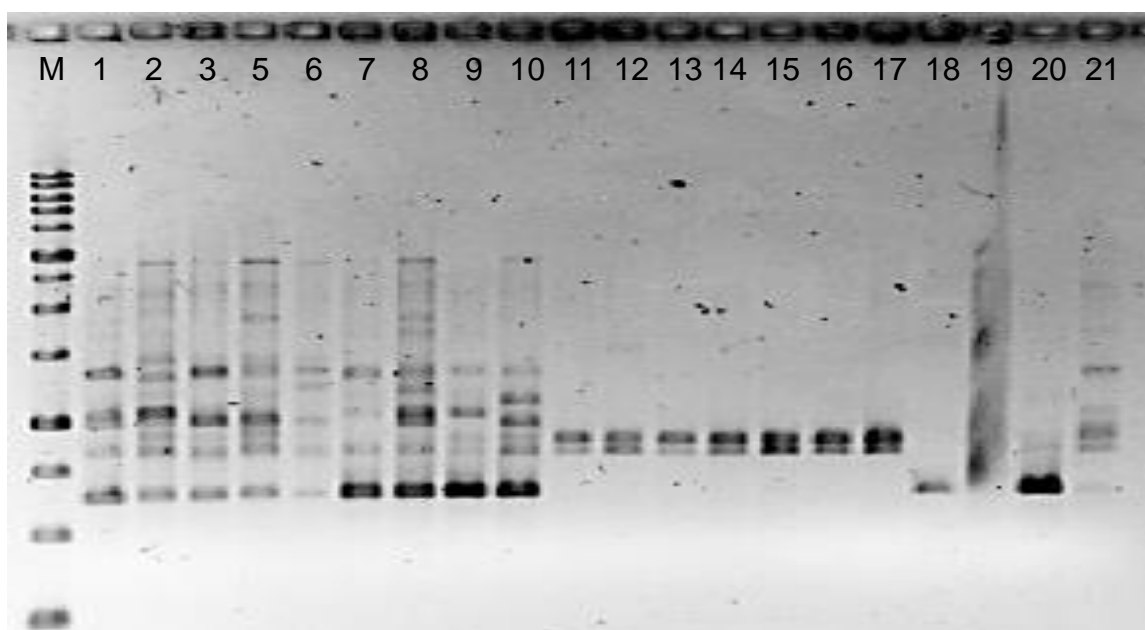


Figura 6 – Perfil de amplificação de ISSR detectados em 20 amostras de sapucaia utilizando-se o *primer* UBC 873 e o marcador (M) de 1 kb em gel de agarose de 1,2%.

Cada *primer* originou entre três e 10 bandas e estas amplificadas pelos ISSR foram muito variáveis. Apenas três dos 74 locos foram monomórficos para as 20 matrizes de sapucaia (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise descritiva dos *primers*, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo.

<i>Primers</i>	Número total de bandas	Número de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
UBC 807	10	10	100
UBC 826	5	5	100
UBC 841	3	3	100
UBC 842	6	6	100
UBC 844	3	3	100
UBC 845	6	6	100
UBC 852	8	7	87,5
UBC 853	5	3	60
UBC 856	8	8	100
UBC 867	3	3	100
UBC 868	4	4	100
UBC 873	8	8	100
UBC 880	5	5	100



Total	74	71	96,7
-------	----	----	------

Utilizando-se dois marcadores moleculares, ISSR e SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*), para analisar a diversidade genética de *Simarouba glauca* DC., Kumar e Agrawal (2017) encontraram baixa percentagem de polimorfismo (14,4 e 26,5%, respectivamente) e baixa diversidade genética. No entanto, para *Moringa oleifera* Lam. foi detectada alta percentagem de polimorfismo (82,8%) e alta diversidade genética utilizando-se o marcador SSR (*Simple Sequence Repeats*) (GANESAN et al., 2014). Estes resultados evidenciam que a porcentagem de polimorfismo é uma característica que permite analisar a divergência genética, sugerindo que a diversidade da sapucaia também é alta, principalmente considerando que o polimorfismo encontrado foi de 96,7%. Na castanheira do Brasil foi encontrado alto grau de polimorfismo (93,3%), utilizando-se um outro marcador molecular dominante *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), entretanto, este resultou em menor divergência genética entre as populações (COELHO et al., 2017).

## 6. CONCLUSÕES

A diversidade fenotípica da sapucaia é alta em que, as características que mais contribuem em ordem decrescente são: Mn>TME>Germinação>Fe>Emergência. A divergência molecular revela alto polimorfismo.

A germinação das sementes de sapucaia é desuniforme e lenta, apresentando poliembrionia. Recomenda-se o uso de tratamentos físicos nos tegumentos e reguladores de crescimento nas sementes de sapucaia para a superação da dormência.

As castanhas de sapucaia não apresentaram níveis tóxicos de selênio, macro e micronutrientes.

A matriz 21 com 32,40  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Se é a mais recomendada para o consumo diário de  $\frac{1}{4}$  de suas castanhas.

As matrizes 8 e 20 apresentam maior quantidade de manganês (175,4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e ferro (71,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas castanhas, respectivamente.

A sapucaia pode ser no futuro próximo uma grande competidora de mercado da atual castanha do Brasil (*B. excelsa*) e demais castanhas, podendo ser utilizada como alimento funcional.

A metodologia proposta da utilização de imagens de raios X para estimar a densidade das sementes de sapucaia é precisa, rápida e inovadora.

## 7. REFERÊNCIAS

- AMTMANN, A.; ARMENGAUD, P. Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 275-283, 2009.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2a Ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2009. 532 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS, 2009. 395p.
- CARDOSO, B. R. et al. Effects of Brazil nut consumption on selenium status and cognitive performance in older adults with mild cognitive impairment: a randomized controlled pilot trial. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 107-116, 2016.
- CARVALHO, I. M. M. et al. Caracterização química da castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess) da região da zona da mata mineira. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 971-977, 2012.
- COELHO, L. M. et al. Genetic diversity in populations of Brazil nut. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 382-389, 2017.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**, Viçosa: UFV, 2012. 514p.
- DELGADO, A. A. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía Mesoamericana**, v. 17, n. 2, p. 221-242, 2006.
- DENADAI, S. M. S. et al. *In vitro* digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1.ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 99p.
- FAXITRON. **User manual Faxitron D X radiography system**. Lincolnshire: [s. n.], 2009. 95p.
- FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. v. 2, Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. 580p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.
- GANESAN, S. K. et al. Genetic diversity and population structure study of drumstick (*Moringa oleifera* Lam.) using morphological and SSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 60, n. 1, p. 316-325, 2014.

GOLDSCHIMILD, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUSWIG, C. H. (Eds). **Lignins**. New York: Wiley Interscience, 1971, p. 24 1-246.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: Método Klarson modificado. **O papel**, v. 47, n. 8, p. 36-38, 1986.

GUPTA, S.; GUPTA, M. Alleviation of selenium toxicity in *Brassica juncea* L.: salicylic acid-mediated modulation in toxicity indicators, stress modulators, and sulfur-related gene transcripts. **Protoplasma**, v. 253, n. 6, p. 1515-1528, 2016.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 259-266, 2009.

IOM - Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington, DC: The National Academies Press, 2000. 529p.

KULIGOWSKA, K. et al. Evaluation of reproductive barriers contributes to the development of novel interspecific hybrids in the *Kalanchoë* genus. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 15, p. 1-15, 2015.

KATO, M. A. et al. Selenium decreases thyroid cancer cell growth by increasing expression of GADD153 and GADD34. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 1, p. 66-73, 2010.

KUMAR, J.; AGRAWAL, V. Analysis of genetic diversity and population genetic structure in *Simarouba glauca* DC. (an important bio-energy crop) employing ISSR and SRAP markers. **Industrial Crops and Products**, v. 100, n. 1, p. 198-207, 2017.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 173p.

LETSIOU, S. et al. Serum total selenium status in Greek adults and its relation to age. The ATTICA study cohort. **Biological Trace Element Research**, v. 128, n. 1, p. 8-17, 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, v. 1. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 384p.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 250-258, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. **Lecythidaceae part II: the zygomorphic-flowered new world genera (*Couroupita*, *Corythophora*, *Bertholletia*, *Couratari*, *Eschweilera*, & *Lecythis*)**, with a study of secondary of neotropical lecythidaceae. New York: The New York Botanical Garden, 1990. 375p. (Flora Neotropica. Monograph, 21 II).

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**, National Academies Press, 2006. 1329p.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 26, p. 11087-11092, 2007.

PILON-SMITS, E. A. H. et al. Physiological functions of beneficial elements. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 267-274, 2009.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: FEALQ, 2009. 451p.

QUINN, C. F. et al. Selenium accumulation in flowers and its effects on pollination. **New Phytologist**, v. 192, n. 3, p. 727-737, 2011.

R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2017.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n.1, p. 9–17, 2002.

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2002. 289p.

RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010. 179p.

RODRIGUES, A. P. A. C. et al. Tratamentos para superar a dormência de sementes de *Acacia mangium* Willd. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 279-283, 2008.

SAMPAIO, P. T. B. Castanha-sapucaia (*Lecythis pisonis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e tecnológico, 2000. p. 141-147.

SILVA, C. B. M. C. et al. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 14122-14152, 2014.

SILVA, D.J.H. et al. Stability of genetic divergence among eggplant accesses in three stages of development. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 135-43, 2001.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Embrapa Informação Tecnológica, Rio de Janeiro, Brasil. 2009. 627p.

SOUZA, I. G. B. et al. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. ("Bacurizeiro") using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 5, p. 3835-3845, 2013.

SOUZA, V. A. B. et al. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 946-952, 2008.

SOUZA, T. V. et al. Seed dormancy in tree species of the Tropical Brazilian Atlantic Forest and its relationships with seed traits and environmental conditions. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 243-264, 2015.

SUJII, P. S. et al. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 4, p. 955-964, 2015.

SUJII, P. S. et al. Morphological and molecular characteristics do not confirm popular classification of the Brazil nut tree in Acre, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 4018-4027, 2013.

TAPPI - Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **TAPPI test methods T 264 om-88**: preparation of wood for chemical analysis. Atlanta: Tappi Technology Park, v. 1, 1992.

TAPPI - Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **TAPPI test methods T 257 om-92**: sampling and preparing wood for analysis. Atlanta: Tappi Technology Park, v. 1, 1992.

VALLILO, M. I. et al. *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 197-200, 1998.

VIJAYAN, K. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis. **International Journal of Industrial Entomology**, v. 10, n. 2, p. 79-86, 2005.

WONGSAWAD, P.; PEERAPORNPIHAL, Y. Molecular identification and phylogenetic relationship of green algae, *Spirogyra ellipsospora* (Chlorophyta) using ISSR and rbcL markers. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2014.

YU, J. et al. Genetic diversity and population structure of *Stipa bungeana*, an endemic species in Loess Plateau of China, revealed using combined ISSR and SRAP markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 1097-1108, 2014.